Electroforesis bidimensional de campos pulsados en minicámaras para caracterizar los cromosomas de *Cryptococcus neoformans:* procedimiento bioinformático

Karen León-Arcia

Dpto. Biología Molecular, Centro de Neurociencias de Cuba, Ave 25, esquina 158, Cubanacán, Playa, La Habana. kla@cneuro.edu.cu

Recibido: 28 de abril de 2014. Aceptado: 3 de febrero de 2015.

Palabras clave: Cryptococcus neoformans, Electroforesis de Campos Pulsados (ECP), tipificación molecular, electroforesis bidimensional.
Key words: Cryptococcus neoformans, Pulsed Field Gel Electrophoresis, Molecular subtyping, Two-dimensional electrophoresis.

RESUMEN. *Cryptococcus neoformans* es una levadura que provoca meningoencefalitis comúnmente en pacientes inmunodeprimidos. El incremento en su incidencia ha motivado estudios epidemiológicos de aislados clínicos para establecer redes de vigilancia. La electroforesis de campos pulsados (ECP) es una de las técnicas más utilizadas en la subtipación molecular de microorganismos con fines epidemiológicos, por su versatilidad y reproducibilidad; sin embargo, el análisis del genoma de eucariotas mediante un único experimento de ECP solo revela aquellas mutaciones que modifican el tamaño de sus cromosomas. El presente trabajo propone una metodología para caracterizar el genoma de *C. neoformans* mediante ECP bidimensional y describe el procedimiento bioinformático que permitió el diseño y la comprobación *in silico* de la utilidad de dicha metodología. La separación de los cromosomas intactos de las cepas estudiadas en la primera dimensión (1D) se logra en 9.3 h de ECP en una cámara miniCHEF, aplicando tiempos de pulso (*tp*) entre 30 y 90 s. La huella digital cromosomal se obtuvo en la segunda dimensión (2D) después de la restricción de las bandas obtenidas en 1D con Not I o Sfi I y la separación de los fragmentos en la cámara miniCHEF, aplicando *tp* entre 1 y 15 s durante 5 h. Esta metodología evidencia las diferencias genéticas entre cepas de *C. neoformans* invisibles en la 1D, luego de 14,3 h de electroforesis (1D + 2D), en contraste con las 30 a 40 h que tomaría una ECP en cámaras CHEF convencionales. Esta metodología pudiera implementarse para el estudio del genoma de otras especies de eucariotas unicelulares.

ABSTRACT. *Cryptococcus neoformans* is a pathogenic yeast that causes meningoencephalitis, specially in AIDS patients. Epidemiological studies of clinical isolates have been encouraged due to the increase in its incidence for infection monitoring and control. Pulsed Field Gel Electrophoresis (PFGE) is the most popular technique for microbial molecular subtyping with epidemiological purpose, because of its versatility and reproducibility, but the analysis of eukaryotic genomes, like *C. neoformans*, in a single PFGE experiment, does not reveal mutations that do not alter the chromosomes size. That is why the author proposes a two-dimensional PFGE methodology for the *C. neoformans* genome characterization. The present describes the bioinformatic procedure used to design and verify *in silico* the efficacy of such methodology. The resolution of the intact chromosomes was achieved in the first dimension (1D) after 9.3 h of electrophoresis in the CHEF minichamber, applying pulses between 30 and 90s. The chromosomal fingerprint was obtained in the second dimension (2D) after restrict the individual bands with Not I or Sfi I and then separate the fragments in the CHEF minichamber applying pulses between 1 and 15 s for 5 h. The proposed methodology reveals the genetic differences in the genome of *C. neoformans* strains that were invisible in 1D, in 14.3 h of electrophoresis (1D + 2D), in contrast with the 30-40 h that takes a PFGE in regular electrophoretic chambers. Such methodology could be applied for studying the genome of other unicellular eukaryotic species.

INTRODUCCIÓN

La cripotococosis es una infección provocada por la levadura *Cryptococcus neoformans* que puede desencadenar meningoencefalitis y afecta principalmente a individuos inmunodeprimidos o inmunocomprometidos.[1,2] Desde la aparición del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), se ha producido un gran incremento en su incidencia, como una afección micótica oportunista.[3,4] Esta situación ha demandado la investigación epidemiológica de aislamientos ambientales y clínicos. Al respecto se ha propuesto el establecimiento de redes de vigilancia epidemiológica con la participación de laboratorios de referencia que permitan su identificación y monitoreo.[5]

Para el estudio de la epidemiología del *Cryptococcus neoformans* se han aplicado varias técnicas de tipificación basadas en caracteres genéticos.[6] En particular la Electroforesis de Campos Pulsados (ECP) ha resultado un método útil y técnicamente simple para determinar la relación clonal de cepas involucradas en eventos epidemiológicos.[7,8,9] Sin embargo, el cariotipaje no evidencia los cambios en la secuencia de bases del ADN cromosomal que provocan diferencias de tamaño por debajo del 5-10 % [10]. Por esa razón, se ha propuesto el análisis bidimensional del ADN de eucariotas mediante ECP (2D-ECP).[11] La 2D-ECP consiste en la obtención del cariotipo electroforético del microorganismo (primera dimensión [1D]), la escisión del patrón de bandas y su aplicación en otro gel, el cual se somete a otra ECP (segunda dimensión [2D]) en condiciones de electroforesis diferentes a las de la 1D. Las moléculas del patrón de bandas 1D pueden ser digeridas o no con enzimas de restricción.[11,12]

El análisis bidimensional, a diferencia del que se realiza en una sola dimensión, ha permitido explorar mayores regiones del genoma de eucariotas y detectar variaciones en el tamaño de los cromosomas de estos organismos que no han sido detectadas en una única ECP.[11,12] Además, la 2D-ECP, combinada con la restricción en el propio gel de las moléculas de ADN, ha facilitado el mapeo de genes en los cromosomas del parásito intracelular *Encephalitozoon cuniculi*[13] y la construcción del mapa físico de cromosomas circulares en especies bacterianas como *Micoplasma mobile*, *Pseudomonas aeruginosa* PAO y *Anabaena* sp.[14,15,16]

Los procedimientos de 2D-ECP descritos requieren de largos tiempos de electroforesis y gran cantidad de reactivos porque usan los sistemas convencionales de ECP.[11,17] A esto se adicionan los gastos de tiempo y reactivos que requiere la selección de las condiciones adecuadas de ECP para la obtención de patrones de bandas de ADN en la 1D y 2D, debido a que este proceso se realiza a través de ensayos de prueba y error. Lo cual quedaría resuelto con la utilización de la tecnología de ECP en minigeles (miniECP), que emplea cinco veces menos cantidad de reactivos químicos y reduce de cuatro a cinco veces los tiempos de electroforesis.[12,18,19,20]

El sistema de miniECP Guefast 06®[20] cuenta con un simulador (*PFGESimulator*)[21] basado en las ecuaciones que describen la migración de moléculas de ADN lineales en el CHEF (*Contour Clamped Homogeneous Electric Field*), que permite generar las condiciones de electroforesis en cámaras miniCHEF y simular los patrones de bandas de moléculas de ADN que se obtendrían.[21,22]

De esta manera se pueden seleccionar *a priori* las condiciones experimentales que mejor resuelvan los cariotipos electroforéticos y los macrofragmentos de restricción de los cromosomas individuales de *C. neoformans*, u otro organismo eucariota unicelular. De igual forma se podría seleccionar *a priori*, la enzima de restricción para generar dichos macrofragmentos de restricción de los cromosomas individuales (o la huella digital cromosomal) de estos organismos mediante 2D-miniECP. Dichas condiciones experimentales permitirán caracterizar de forma rápida el genoma de cepas de *C. neoformans* mediante 2D-miniECP, y pueden evidenciar la presencia de mutaciones puntuales o reordenamientos génicos en los cromosomas de este microorganismo.

El objetivo de este trabajo es determinar *in silico* las condiciones de ECP en miniCHEF que permiten el análisis bidimensional del genoma de las cepas *C. neoformans* B3501A y JEC21 y las enzimas de restricción útiles para obtener la huella digital de cada uno de los cromosomas en la

segunda dimensión. Además, evaluar *in silico* la utilidad de la información obtenida en la segunda dimensión para comparar el genoma de cepas de *Cryptococcus neoformans*.

MATERIALES Y MÉTODOS

En este trabajo se describe el procedimiento bioinformático que permitió la selección de los regímenes de tiempos de pulsos que generan el cariotipo electroforético y la huella digital cromosomal de *C. neoformans*, así como la(s) enzima(s) de restricción que evidencien los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción del ADN cromosomal en la 2D.

Moléculas de ADN utilizadas en las simulaciones

Las secuencias de bases del ADN de las cepas *Cryptococcus neoformans* B3501A y JEC21 se obtuvieron del sitio web: http://www.ebi.ac.uk/genomes/eukaryota.html. Para obtener dichas secuencias se emplearon las herramientas de software del sistema operativo Windows 7. El tamaño de las moléculas de ADN correspondiente a cada uno de los cromosomas de estos microorganismos se utilizó para simular en computadora los patrones de bandas en la 1D. Por otra parte, para simular los patrones de bandas que se obtendrían en la 2D, se utilizó el tamaño de los macrofragmentos de restricción del ADN de los cromosomas individuales generados previamente por la digestión virtual de sus secuencias de bases con diferentes enzimas.

Simulación de los patrones electroforéticos de ECP

Los patrones electroforéticos que se obtendrían en la cámara miniCHEF se simularon utilizando el software *PFGESimulator*.[21] Este software simula los patrones de bandas basándose en la ecuación que describe la migración del ADN lineal en CHEF[22], para lo cual dibuja un rectángulo de (largo x ancho) 256 x 339 píxeles (1 píxel = 0.02 cm) que representa un gel virtual. Dentro del rectángulo se representan 12 o 19 pocillos, según se seleccione, donde se aplicarían las muestras en una electroforesis real y debajo de cada pocillo, se dibuja el patrón de bandas virtual de las moléculas de ADN que se obtendría experimentalmente. Todas las simulaciones se realizaron asumiendo campos eléctricos de 10 V/cm, temperatura del tampón TBE 0.5 X (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1 mM, pH 8.3) de 20 °C y gel de agarosa al 1.5 %. Se simularon los cariotipos electroforéticos (que se obtendrían en la 1D) formados por los cromosomas intactos y las huellas digitales cromosomales (que se obtendrían en la 2D) formados por los macrofragmentos de restricción de los cromosomas individuales contenidos en las bandas que en ambas cepas de *C. neoformans* migraron la misma distancia los patrones 1D (bandas comunes).

Diseño *in silico* de las rampas de *tp* necesarias para separar las moléculas de ADN en cámaras miniCHEF. La predicción de los patrones de bandas

Las condiciones electroforéticas iniciales, utilizadas para simular los patrones de bandas del ADN de las cepas de *C. neoformans* en la 1D y 2D, se estimaron a partir del cálculo de los tiempos de reorientación (*tr*) de las moléculas de ADN mediante las ecuaciones descritas por López-Cánovas y col.[22] Estas ecuaciones describen las velocidades de migración (cm/s) durante y después de la reorientación (*vr* y *vm*, respectivamente), así como, *tr* (s) y la migración total de moléculas de ADN de cualquier tamaño sometidas a electroforesis en miniCHEF.[22]
Las ecuaciones descritas son:

$$vr = 0.0207\ [Q\ 1.1\ E^{1.45}/(8\pi\eta L^{1.35})]; \quad (1)$$

$$vm = 0.665\ [Q\ 1.1\ E^{1.76}/(8\pi\eta L^{1.08})]; \quad (2)$$

$$tr = 0.134\ (L^{1.14} / vr)^{0.926}; \quad (3)$$

Donde:
Q carga neta (en statcoulomb) de la molécula de ADN y se calcula como 1*e-•pb*.
e electrón () y *pb* la cantidad de pares de bases.
L largo del contorno (en cm) de la molécula lineal de ADN, y se calcula como 0.34 nm•pb.
E campo eléctrico (en statvolt/cm).
η viscosidad de la disolución estabilizadora (en Poises). Esta última se calcula interpolando el valor de la temperatura del tampón TBE 0.5 X en un polinomio que describe la relación entre la viscosidad del agua y su temperatura en °C.
Los regímenes de *tp* aplicados en las simulaciones consistieron en secuencias (rampas) de *tp*. La selección de los *tp* límites de las rampas que se aplicarían en las corridas *in silico* se realizó a partir de los valores de los *tr* de las moléculas de ADN de las cepas en estudio, calculados con las ecuaciones (1) y (3). El criterio que se empleó para seleccionar dichos límites fue que los *tp* de máxima y mínima duración debían poseer valores comprendidos dentro del rango $0.1 \leq tr/tp \leq 1.0$, donde *tr* es el tiempo de reorientación de las moléculas de ADN de mayor y menor tamaño que se requerían separar. Los *tp* intermedios (*tp*2…*tp*[n-1]) se calcularon considerando que debían poseer valores cercanos a los tiempos de reorientación de las moléculas que se pretendían resolver. Las correspondientes cantidades de repeticiones (*Np*1, *Np2*…*Np*n) de cada tiempo de pulso (*tp*1, *tp*2…*tp*n) se estimaron con el software *PFGESimulator* fijando *Np*1= *Np*2 =...*Np*n y cambiando estos valores hasta obtener la resolución deseada en aproximadamente 5 ó 10 h de electroforesis. Las condiciones de *tp* y *Np* se suministraron como condiciones iniciales al simulador del *PFGESimulator* y se modificaron, paso a paso, siguiendo el procedimiento de prueba y error hasta que se obtuvieron patrones de bandas donde aparecían resueltas la mayor cantidad de moléculas de ADN.

Selección de las enzimas de restricción para el análisis 2D-miniECP
Las secuencias de bases del ADN de las cepas *C. neoformans* B3501A y JEC21 se analizaron mediante la aplicación de búsqueda de sitios de restricción con la ayuda del software *PFGESimulator*. Este software carga la secuencia de bases del ADN del genoma de cualquier organismo, identifica la posición de los sitios de restricción para todas las enzimas de restricción conocidas y brinda, como datos de salida, la cantidad y tamaño de los fragmentos de ADN generados con cada enzima de restricción. Se seleccionaron las enzimas de restricción que cortaran 60 veces, o menos, las secuencias de los cromosomas procesados y que al menos el 50% de los fragmentos generados fueran mayores de 20 kb.

Determinación de la similitud entre las cepas de *C. neoformans*
Las imágenes de los patrones virtuales del ADN de las cepas de *C. neoformans* B3501A y JEC21, obtenidos en la 2D, se sometieron a un análisis densitométrico mediante el software *GuefastScan*® (Neuronic SA, La Habana, Cuba).[23] Las parejas de patrones de restricción del ADN de las bandas comunes en los cariotipos electroforéticos de las dos cepas, se compararon entre sí. Para dicha comparación se consideraron como bandas, todos los pixeles comprendidos en las regiones de los patrones virtuales donde existió baja resolución en los fragmentos de restricción. Se determinó la similitud entre todas las parejas de patrones de bandas de ADN obtenidos en la 2D para las dos cepas de *C. neoformans*, a través del cálculo del coeficiente de DICE[24] y con la ayuda del *GuefastScan*®.[23]

RESULTADOS Y DISCUSIÓN
El procedimiento bioinformático que permitió la determinación de las condiciones experimentales para la rápida caracterización del genoma de cepas *C. neoformans* mediante 2D-miniECP, se realizó a partir del análisis de las secuencias disponibles en las bases de datos en internet de las

cepas B3501A y JEC21. El mismo comprendió la selección de las enzimas de restricción adecuadas para fragmentar los cromosomas individuales, así como, de los regímenes de *tp* para obtener el cariotipo electroforético en la 1D y la huella digital cromosomal en la 2D, a través de la simulación en computadora de los patrones de bandas que se obtendrían en miniCHEF al separar los cromosomas intactos y sus macrofragmentos de restricción.

Simulación del análisis en la 1D del genoma de cepas de *C. neoformans*

La simulación de una rampa de *tp* entre 90 y 30 s durante 9.3 h permitió resolver virtualmente las moléculas del ADN cromosomal intacto de las cepas B3501A y JEC21 en patrones con 10 y 12 bandas respectivamente, de un total de 14 cromosomas en ambas cepas (Fig. 1). La aplicación de esta rampa de tiempos de pulsos, garantizó la separación adecuada de los cromosomas intactos que poseían tamaños en un rango de tallas amplio (de 700 a 2300 kb; Fig. 1). Sin embargo, algunos de los cromosomas de la cepa B3501A comigraron en una única banda, como los cromosomas X y XI (1063 y 1086 kb); VI y VII (1414 y 1411 kb); I, II y III (2297, 2283 y 2079 kb), debido a que poseen tamaños que se diferencian en muy pocas kb (Fig. 1A). De forma semejante ocurrió con el patrón de la cepa JEC21, en el que comigraron los cromosomas VIII y IX (1178 y 1194 kb) y los cromosomas I y III (2300 y 2105 kb) (Fig. 1B). Estas parejas de moléculas no fue posible resolverlas bajo ninguna otra condición de *tp* (resultados no mostrados) porque, al diferir entre ellas en solo en unas pocas kb, sus *tr* (Tabla 1) y velocidades de migración son semejantes, lo cual hace muy difícil que puedan ser resueltas mediante ECP.

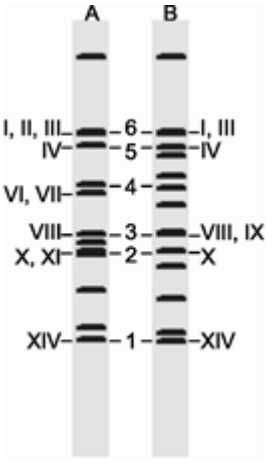

***Fig. 1**: Cariotipos electroforéticos virtuales de las cepas de C. neoformans B3501A (**A**) y JEC21 (**B**) que se obtendrían en la cámara miniCHEF, bajo condiciones de campo eléctrico 10 V/cm, agarosa 1.5 %, temperatura del tampón 20 °C, TBE 0.5X, usando la rampa de tp(s)-Np: (90-45) (70-100) (40-120) (30-30): 9.3 h de electroforesis.*

La rampa de *tp(s)-Np*: (90-45) (70-100) (40-120) (30-30), permitió separar virtualmente la mayoría de los cromosomas de ambas cepas de *C. neoformans* en un tiempo de electroforesis de 9.3 h, tres veces menor que el descrito en la literatura, el cual oscila entre 30 a 40 horas.[24,25,26] Esta disminución en el tiempo de electroforesis, con respecto a los protocolos utilizados hasta el momento, debe facilitar la obtención de los cariotipos electroforéticos de *C. neoformans* experimentalmente, a lo que se le adicionaría el ahorro en reactivos que implica el uso de la tecnología para realizar ECP en minigeles. Los cariotipos electroforéticos virtuales de las dos cepas estudiadas, muestran 6 bandas comunes que se señalan en la Fig. 1 con números arábigos, como resultado de que bajo esas condiciones de electroforesis ambas cepas contienen cromosomas que migran la misma distancia en el gel. Estas bandas comunes están formadas por cromosomas de tamaños semejantes (Fig. 1), los cuales solo podrían ser discriminados analizando

la secuencia de bases del ADN. Para diferenciar estas moléculas indistinguibles en la 1D, proponemos un análisis bidimensional, que permita obtener la huella digital cromosomal, después de digerir los cromosomas individualmente con enzimas de restricción adecuadas para generar macrofragmentos que puedan ser comparados al separarlos mediante una segunda ECP.

Las enzimas de restricción que evidencian polimorfismos de los fragmentos de restricción de los cromosomas que migran igual en los cariotipos de las cepas *C. neoformans* B3501A y JEC21

Para simular el análisis en la 2D del genoma de *C. neoformans* se determinó cuáles enzimas de restricción son útiles para obtener la huella digital de los cromosomas individuales, involucrados en las bandas comunes de los cariotipos electroforéticos de las cepas B3501A y JEC21. Este análisis permitiría detectar las diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción, como indicativo de las diferencias en la secuencia de bases de moléculas de tamaños semejantes en ambas cepas.

Las enzimas Asc I, Fse I, Not I, Pac I y Sfi I generaron virtualmente menos de 60 fragmentos de los cromosomas I, II, III, IV, V, VIII, X, XI y XIV de las dos cepas de *C. neoformans* y más de la mitad de dichos fragmentos poseían tamaños mayores de 20 kb (Tabla 1). Con excepción del ADN del cromosoma XIV de la cepa B3501A, en el cual la enzima Pme I no posee sitios de restricción, el resto de los cromosomas involucrados en las bandas comunes se digirieron virtualmente con Pme I de forma semejante a como lo hicieron las enzimas mencionadas anteriormente. La mayoría de los fragmentos de restricción de los cromosomas analizados con las seis enzimas tenían tamaños diferentes al comparar ambas cepas, que oscilaron entre 20 y 600 kb (Tabla 1). Sin embargo, el ADN del cromosoma II brindó fragmentos de hasta 1000 kb cuando se digirió virtualmente con cualesquiera de las enzimas preseleccionadas (Tabla 1, fila 2). La enzima Asc I también generó fragmentos con tamaños en el orden de las 700 kb del ADN de los cromosomas I y X (Tabla 1, filas 1 y 3), mientras que Pme I digirió el ADN de los cromosomas III y XIV (cepa JEC21) en fragmentos con tamaños de hasta 700 y 800 kb, respectivamente (Tabla 1, filas 3 y 5).

Todas las enzimas preseleccionadas mediante el análisis *in silico* permitieron detectar diferencias entre las dos cepas en cuanto al tamaño y la cantidad de los fragmentos de restricción generados por ellas. El tamaño de los fragmentos de algunos cromosomas fue hasta tres veces superior en una cepa en relación con la otra, por ejemplo, el tamaño del fragmento mayor del cromosoma II generado con Pac I fue de 928 kb en la cepa B3501A y de 290 kb en la cepa JEC21, ya que el ADN de esta última poseía un sitio más de corte (Tabla 1, fila 2).

La cantidad de fragmentos de un cromosoma con la misma enzima varió desde 1 hasta 6 en una cepa en relación con la otra, como en el caso del ADN del cromosoma III de la cepa B3501A, que con la enzima Not I se restringe en 36 fragmentos, mientras que en la cepa JEC21 en 42 fragmentos (Tabla 1, fila 3). Sin embargo, en este caso el tamaño de los fragmentos fue semejante.

Estos resultados sugieren que si se resolvieran los fragmentos generados por cualquiera de estas seis enzimas preseleccionadas, en forma de patrones de bandas mediante miniCHEF, sería posible evidenciar los polimorfismos de los fragmentos de restricción de los cromosomas de tamaños semejantes en las capas B3501A y JEC21 de *C. neoformans*.

Tabla 1. Enzimas que generan hasta 60 fragmentos y que al menos el 50 % de ellos tienen tallas mayores que 20 kb al digerir virtualmente cada uno de los cromosomas de las cepas de *C. neoformans* B3501A y JEC21 involucrados en las bandas comunes de sus cariotipos electroforéticos

		B3501A		JEC21			B3501A		JEC21	
Enz.	Crom.	Bandas > 20kb/ Total	Intervalo tallas (kb)	Bandas > 20kb/ Total	Intervalo tallas (kb)	Crom.	Bandas > 20kb/ Total	Intervalo tallas (kb)	Bandas > 20kb/ Total	Intervalo tallas (kb)
Asc I		14/17	4-685	14/17	4-683		5/6	17-363	7/7	69-258
Fse I		16/21	1-517	17/22	1-517		6/8	0-518	9/10	0.9-233
Not I	**I**	24/29	0.5-374	26/29	0.5-375	**VIII**	11/17	4-334	10/12	5-257
Pac I		30/50	0-254	32/53	0-173		13/14	12-166	11/16	0-242
Pme I		16/18	4-375	17/18	4-375		9/9	28-334	9/10	4-319
Sfi I		26/37	0-268	26/34	0-266		11/14	0-424	8/9	2-355
Asc I		5/5	105-910	5/5	105-738				5/6	17-363
Fse I		8/8	19-769	8/8	19-711				6/8	0-523
Not I	**II**	14/16	2-1078	14/17	2-435	**IX**			9/15	4-184
Pac I		17/24	3-927	18/25	3-290				14/16	0-141
Pme I		14/16	15-838	13/15	15-416				9/9	28-340
Sfi I		15/20	0-805	17/23	0-467				11/15	0-421
Asc I		14/14	28-254	14/15	3-288		5/6	10-430	4/5	10-781
Fse I		16/21	1-391	15/20	1-391		10/11	7-451	10/11	7-451
Not I	**III**	28/36	0-338	31/42	0.3-201	**X**	10/14	0.2-195	12/17	0.2-186
Pac I		28/36	0-259	28/37	0-256		10/18	0-270	10/18	0-270
Pme I		9/11	0-854	9/11	0.4-886		8/8	27-351	8/8	21-354
Sfi I		19/26	0-307	21/28	0-248		7/10	0-307	8/11	0-308
Asc I		11/14	4-392				9/11	3-302		
Fse I		11/17	0.2-261				9/11	5-198		
Not I	**IV**	16/20	5-317			**XI**	9/13	1-236		
Pac I		25/34	0-145				13/16	1-202		
Pme I		8/9	12-503				4/5	0.4-403		
Sfi I		16/23	0.2-440				9/15	0.7-342		
Asc I		11/12	0.7-410	10/10	22-442		3/3	67-568	3/3	67-564
Fse I		6/8	4-526	6/8	4-527		2/2	157-609	2/2	157-604
Not I	**V**	17/22	0.4-195	20/24	0.4-195	**XIV**	8/10	6-285	8/10	6-291
Pac I		9/11	0.9-335	10/15	1-331		3/3	133-423	3/4	13-405
Pme I		11/12	6-335	11/12	6-367		–	–	2/2	27-735
Sfi I		15/18	5-221	17/20	5-231		9/16	0.3-208	10/16	0.3-175

Obtención *in sílico* de la huella digital de los cromosomas individuales de las cepas *C. neoformans* B3501A y JEC21 en la 2D

Las condiciones para separar los fragmentos de restricción de los cromosomas individuales en el miniCHEF se determinaron siguiendo el mismo procedimiento de selección de los *tp*, que el empleado para separar los cromosomas intactos en la 1D. La simulación de la separación de los fragmentos de restricción generados con las enzimas Asc I, Fse I y Pme I en los cromosomas I, II, III, IV, V, VIII, X, XI y XIV, que se obtendrían en la cámara miniCHEF aplicando la rampa de *tp*(s), *Np*: (15, 100) (10, 150) (5, 300) (3, 500) (1, 3000), reveló que en esas condiciones era posible resolver más del 80 % de los fragmentos mayores de 20 kb (Fig. 2). De forma similar, los patrones de bandas virtuales de los fragmentos de restricción de los cromosomas IV, V, VIII, X,

XI y XIV generados con Not I, Pac I o Sfi I también poseían la mayoría de las bandas bien resueltas en las condiciones de electroforesis mencionadas (Fig. 2). Sin embargo, los patrones de los cromosomas I de ambas cepas, con las enzimas Not I, Pac I o Sfi I poseían múltiples zonas de barrido, en las que comigraron fragmentos de tallas semejantes (Fig. 2, "["). Los patrones de restricción de los cromosomas III, de ambas cepas, con las enzimas Not I y Pac I también presentaron numerosas zonas de barrido (Fig. 2, "["). A pesar de la presencia de las zonas de barrido se pudieron evidenciar diferencias en la longitud de los macrofragmentos de restricción en los cromosomas homólogos de ambas cepas de *C. neoformans* (Fig. 2).

Las enzimas Asc I, Fse I, Pac I y Pme I revelaron polimorfismos de los fragmentos de restricción de al menos tres de las siete parejas de cromosomas homólogos analizados (Fig. 2), mientras que Not I y Sfi I, los evidenciaron en todas las parejas analizadas (Fig. 2). Así, estas dos enzimas revelaron la mayor cantidad de diferencias en la secuencia de ADN del genoma de las dos cepas de *C. neoformans*, las cuales no pudieron ser detectadas en el cariotipo electroforético obtenido en la 1D.

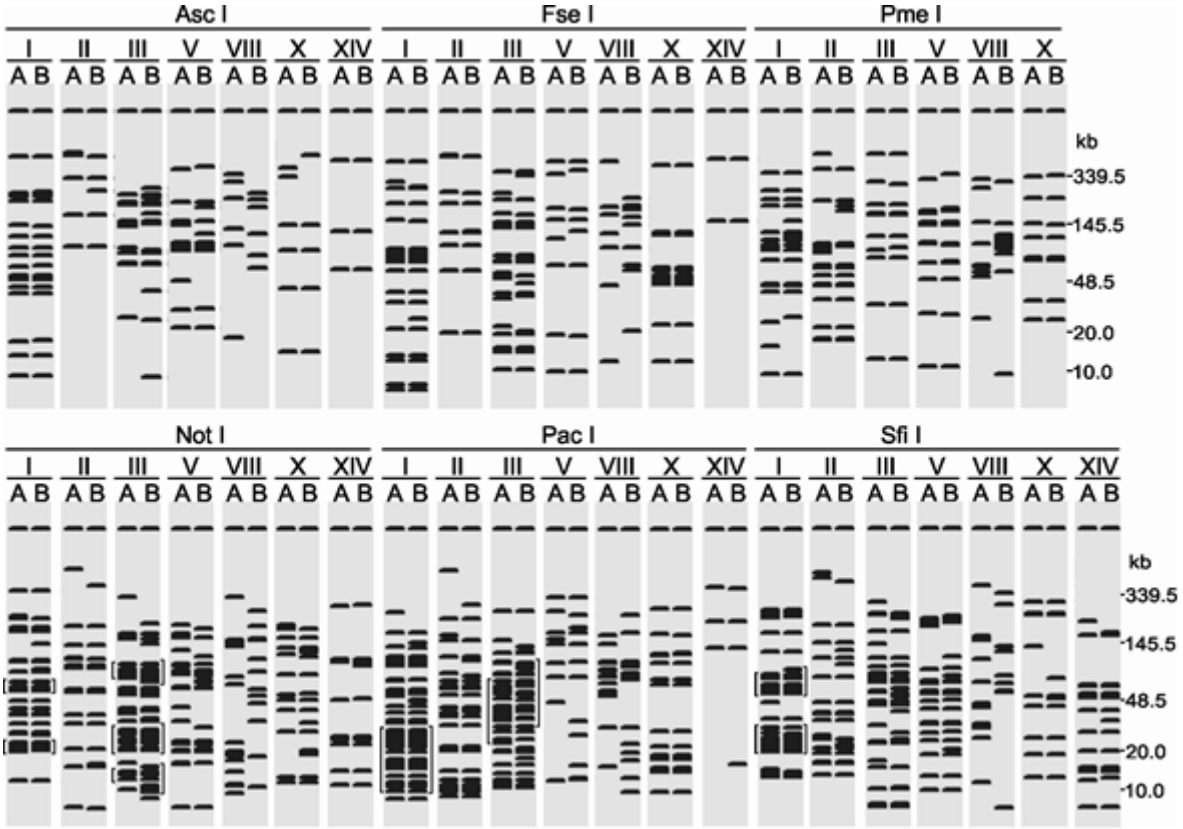

Fig. 2. *Huella digital de los cromosomas I, II, III, V, VIII, X y XIV de las cepas de C. neoformans B3501A (A) y JEC21 (B), generadas virtualmente por la restricción con Asc I, Fse I y Pme I, Not I, Pac I y Sfi I, y por la separación de los fragmentos en miniCHEF con la rampa de tp (s), Np: (15, 100) (10, 150) (5, 300) (3, 500) (1, 3000), en gel de agarosa 1,5 %, 10 V/cm y TBE 0.5X a 20 °C.*

Por tanto, las condiciones experimentales recomendadas para generar la huella digital de los cromosomas de *C. neoformans* B3501A y JEC21 y evidenciar las diferencias entre ellos consiste en la restricción de los cromosomas individuales con Not I o Sfi I y la obtención de los patrones de restricción en la cámara miniCHEF bajo condiciones de campo eléctrico 10 V/cm, temperatura de la disolución estabilizadora 20 °C, TBE 0.5X y la rampa de *tp*(s), *Np*: (15, 100) (10, 150) (5, 300) (3, 500) (1, 3000). Estas condiciones permitieron revelar la información enmascarada en el cariotipo electroforético de las dos cepas de *C. neoformans* analizadas

Evaluación *in silico* de la utilidad de la información revelada en la segunda dimensión para discriminar cepas de *C. neoformans*

Para simular el análisis en la segunda dimensión del genoma de *C. neoformans* se tuvo en cuenta que en las bandas comunes 2, 3 y 6 (Fig. 1) de los cariotipos electroforéticos de las cepas analizadas, comigraron más de un cromosoma en una o ambas cepas y que en la banda común 5 migraron la misma distancia en el gel, cromosomas no homólogos de las dos cepas (Fig. 1). Esto implica que si el análisis en la segunda dimensión se realizara experimentalmente habría que tener en cuenta a todas las moléculas de ADN que comigran en una banda, la cual se la denominaría banda mixta, porque contendría más de un cromosoma. Por lo tanto, en la digestión virtual con Not I o Sfi I de cada una de las bandas mixtas de los patrones se debió contemplar el análisis de restricción de todos los cromosomas contenidos en dichas bandas.

En todas las parejas de patrones de bandas obtenidos por la digestión virtual, tanto con Not I como con Sfi I, de las moléculas de ADN que migraron en las seis bandas comunes, se observó polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción, lo que evidenció las diferencias en la secuencia de ADN que no pudieron ser detectadas cuando se compararon los cariotipos electroforéticos de ambas cepas de *C. neoformans* (Fig. 3). Por ejemplo, el análisis de la banda común 1 resultó en la comparación de los patrones de restricción del cromosoma XIV de cada cepa y evidenció que solo se diferenciaban en una banda (Fig. 3).

Sin embargo, las diferencias entre los cromosomas XIV de ambas cepas fueron más evidentes cuando se obtuvo el patrón de restricción virtual con Sfi I, el cual mostró tres bandas diferentes entre los dos patrones (Fig. 3). En el caso de la banda común 4, que posee cromosomas homólogos en los cariotipos de ambas cepas (cromosoma V), con la enzima Not I se evidenciaron mejor las diferencias entre los patrones de restricción de ese par de moléculas, ya que estos patrones poseían 8 bandas diferentes, mientras que con Sfi I solo presentaban 4.

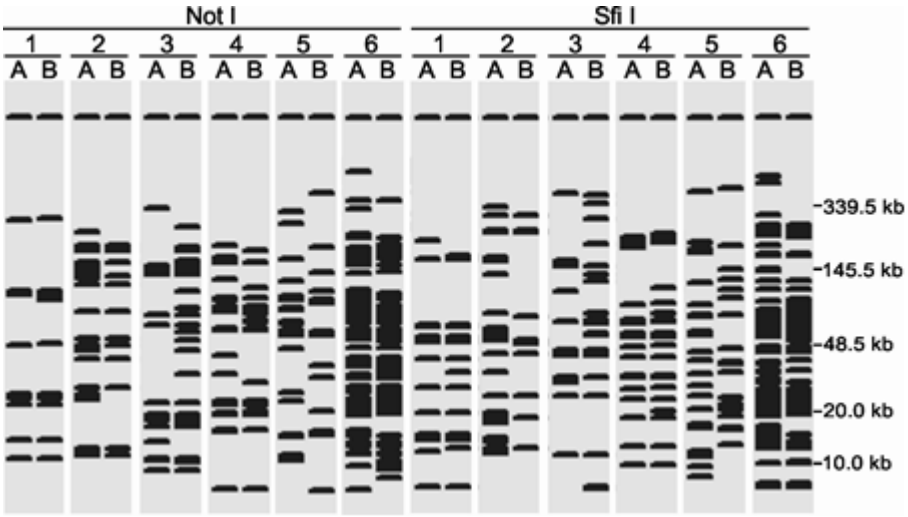

***Fig. 3**. Comparación de los patrones de bandas virtuales de las cepas C. neoformans B3501A (A) y JEC21 (B), obtenidos en la 2D en miniCHEF, agarosa 1,5 %, 10 V/cm, TBE 0,5X a 20 °C y la rampa de tp (s), Np: (15, 100) (10, 150) (5, 300) (3, 500) (1, 3000), luego de la digestión in sílico con Not I y Sfi I de los cromosomas que migraron la misma distancia en sus cariotipos electroforéticos (bandas comunes). Las parejas de patrones de restricción comparados se formaron por la digestión enzimática de: cromosoma XIX de B3501A y cromosoma XIV de JEC21 (1), cromosomas X y XI de B3501A y cromosoma X de JEC21 (2), cromosoma VIII de B3501A y cromosomas VIII y IX de JEC21 (3), cromosoma V de B3501A y cromosoma V de JEC21 (4), cromosoma IV de B3501A y cromosoma II de JEC21 (5) y cromosomas I, II y III de B3501A y cromosomas I y III de JEC21 (6).*

La restricción con Not I o Sfi I de la banda común 2 de la cepa B3501A resultó en un patrón de bandas que combinó los fragmentos de restricción del cromosoma X y el XI, pues se trata de una banda mixta en el cariotipo de esta cepa, el cual se comparó con el patrón de bandas resultante de la digestión del cromosoma X de la cepa JEC21. En consecuencia, los patrones obtenidos poseían diferente forma y cantidad de bandas. La cantidad de bandas diferentes fue de 7 y 8 bandas para Not I y Sfi I, respectivamente, lo cual es explicable porque se compararon los patrones de restricción de dos cromosomas de la cepa B3501A con uno solo en el cariotipo de la cepa JEC21 (Fig. 3).

Un resultado semejante al anterior se obtuvo al comparar los patrones de restricción de las bandas comunes 3 y 6, las cuales también involucraban bandas mixtas, que contenían cromosomas homólogos y no homólogos (Fig. 3). Esta comparación evidenció una cantidad similar de bandas diferentes tanto con Not I (11 y 9 bandas, respectivamente) como con Sfi I (10 y 9 bandas, respectivamente) (Fig. 3).

Por último, la pareja de patrones generados por Not I de las cepas B3501A y JEC21, correspondientes a la banda común 5 mostró 21 bandas diferentes (Fig. 3), lo que evidenció la gran diferencia que existía entre ellos. Estas diferencias se deben a que los cromosomas involucrados en la banda común 5 no son homólogos para ambas cepas (cromosomas IV y II), lo que explicaría que existieran variaciones en la secuencia de bases de dichas moléculas, aun cuando posean el mismo tamaño.

El análisis de la similitud entre los patrones de restricción con Not I o Sfi I de las moléculas contenidas en las bandas comunes del cariotipo electroforético de ambas cepas de *C. neoformans*, mediante el cálculo del coeficiente de DICE, puso en evidencia las diferencias entre ellas (Tabla 2). La presencia de cromosomas homólogos en las bandas comunes arrojó la mayor similitud entre los patrones (bandas comunes 1 y 4, Fig. 3, Tabla 2). Cuando en una banda común existía más de un cromosoma, es decir, era una banda mixta en el cariotipo de una de las dos cepas, el coeficiente de similitud entre los patrones virtuales disminuyó porque uno de los patrones contenía además los fragmentos de restricción de otro cromosoma (bandas comunes 2, 3 y 6, Fig. 3, Tabla 2). Los valores de coeficientes de similitud de DICE menores se obtuvieron cuando las bandas comunes en los cariotipos electroforéticos de las dos cepas estaban formadas por cromosomas no homólogos (banda común 5, Fig. 3, Tabla 2).

Tabla 2. Coeficiente de DICE para cada pareja de patrones de restricción virtuales con Not I o Sfi I de las moléculas contenidas en las bandas comunes de los cariotipos electroforéticos de las cepas *C. neoformans* B3501A y JEC21.

	Coeficiente de DICE	
Banda común	Not I	Sfi I
1	0.92	0.95
2	0.64	0.64
3	0.58	0.52
4	0.68	0.85
5	0.27	0.45
6	0.67	0.75

Los coeficientes de DICE obtenidos en las comparaciones entre los patrones 2D de las bandas comunes de las 2 cepas de *C. neoformans* fueron mayores con Sfi I que con Not I, con excepción de la banda común 3 (Tabla 2). Esto indica que la digestión de los cromosomas de las bandas comunes con Not I en combinación con la separación de los macrofragmentos de restricción utilizando la rampa de *tp*(s), *Np*: (15, 100) (10, 150) (5, 300) (3, 500) (1, 3000), evidenció mejor que Sfi I las diferencias genéticas existentes en las moléculas que fueron indistinguibles en la 1D.

Sin embargo, ambas enzimas permitieron evidenciar de igual forma los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción de los cromosomas, por lo pudieran ser utilizadas indistintamente para el análisis bidimensional de cepas de *C. neoformans*.

CONCLUSIONES

La metodología 2D-miniECP propuesta para caracterizar el genoma de *C. neoformans*, permitiría evidenciar los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de los cromosomas, que serían indetectables al separar los cromosomas intactos en una sola electroforesis. Esta metodología requeriría de la restricción de los cromosomas individuales con las enzimas Not I o Sfi I y los resultados finales se obtendrían después de un total de 14,3 h de electroforesis (1D + 2D), según las simulaciones en computadoras; en contraste con las 30 a 40 h que toma realizar un experimento de ECP como los reportados en la literatura hasta el momento.

El procedimiento descrito para el análisis virtual del genoma de *C. neoformans* mediante ECP bidimensional es potencialmente extensible al análisis del genoma de otras especies. La detección de los polimorfismos de la longitud de los fragmentos de restricción de los cromosomas individuales de tamaño similar permitiría discriminar cepas de microorganismos eucariotas cuyos cariotipos electroforéticos fuesen semejantes. Así, la metodología de 2D-miniECP pudiera brindar información útil para la subtipación molecular de organismos más complejos, como los eucariotas unicelulares, de forma rápida y de fácil interpretación.

REFERNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. García GL, Novoa AM. Criptococosis. Una amenaza para pacientes inmunodeprimidos. Gaceta Médica Espirituana. 2011; 13(3) [Consultada: 24 de abril de 2014]. Disponible en: http://bvs.sld.cu/revistas/gme/pub/vol.13.(3)_15/p15.html
2. Gaona-Flores VA. Central nervous system and *Cryptococcus neoformans*. North American Journal of Medical Science. 2013; 5:492-3.
3. Brizuela S y Montero N. Criptococosis asociado a VIH/SIDA (a propósito de un paciente). Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica. 2013; LXX(605):43-7.
4. Gullo FP, Rossi SA, Sardi JCO, Teodoro VLI, Mendes-Giannini MJS, Fusco-Almeida AM. Cryptococcosis: epidemiology, fungal resistance, and new alternatives for treatment. European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases. 2013; 32(11):1377-91.
5. Meyer W, Castañeda A, Stuatr J, Matthew H, Castañeda E. Molecular typing of iberoamerican *Cryptococcus neoformans* isolates. Emerging Infectious Diseases. 2003; 9(2):189-95.
6. Mitchell TG, Litvintseva AP. Typing species of *Cryptococcus* and epidemiology of cryptococcosis. The Yeast Handbook. Berlin: Springer; 2010; 167-90.
7. Perfect JR, Ketabachi N, Cox GM, Ingram CW, Beiser CL. Karyotyping of *Cryptococcus neoformans* as an epidemiological tool. Journal of Clinical Microbiology.1993; 31:3305-9.
8. Wickes BI, Moore TDE, Kwon-Chung KJ. Comparison or the electrophoretic karyotypes and chromosomal location of ten genes in the two varieties of *Cryptococcus neoformans*. Microbiology. 1994; 140:543-50.
9. Barchiesi F, Hollis RJ, Messer SA, Scalise G, Rinaldi MG, Pfaller A. Electrophoretic karyotype and *in vitro* antifungal susceptibility of *Cryptococcus neoformans* isolates from AIDS patients. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease. 1995; 23:99-103.
10. Goering RV. Pulsed field gel electrophoresis: A review of application and interpretation in the molecular epidemiology of infectious disease. Infection, Genetics and Evolution. 2010, 10:866–875.
11. Brugère JF, Cornillot EW, Méténier G, Vivarès CP. In-gel DNA radiolabelling and two-dimensional pulsed field gel electrophoresis procedures suitable for fingerprinting and mapping small eukaryotic genomes. Nucleic Acids Research. 2000a; 28(10):e48.

12. León K, Riverón AM, Arencibia O, Santamaría Y, López-Cánovas L. Two-dimensional pulsed field minigel electrophoresis with high throughput sample format. Journal of Food Safety. 2013; 33:215-21.
13. Brugère JF, Cornillot EW, Méténier G, Bansimon A, Vivarès CP. *Encephalitozoon cuniculi* (Microspora) genome: physical map and evidence for telomere-associated rDNA units on all chromosomes. Nucleic Acids Research. 2000; 28(10):2026-33.
14. Bautsh W. Rapid physical mapping of the *Mycoplasma* mobile genome by two-dimensional field inversion gel electrophoresis techniques. Nucleic Acids Research. 1988; 16:11461-7.
15. Römling U, Grotues D, Bautsh W, Tümmler B. A physical genome map of *Pseudomonas aeruginosa* PAO. EMBO Journal. 1989; 8:4081-9.
16. Bancroft I, Wolk CP, Oren EV. Physical and genetic maps of the genome of the heterocyst-forming cyanobacterium *Anabaena* sp. strain PCC 7120. Journal of Bacteriology. 1989; 171:5940-8.
17. Klingberg TD, Lesnik U, Arneborg N, Raspor P, Jespersen L. Comparison of *Saccharomyces cerevisiae* strains of clinical and nonclinical origin by molecular typing and determination of putative virulence traits. Fems Yeast Research. 2008; 8(4):631-40.
18. Riverón A, López-Cánovas L, Herrera J, Báez-Camargo M, Higginson D, Orozco E. Fast pulsed field minigel electrophoresis. Analytical Letters. 1995; 28:1973-91.
19. López-Cánovas L, Bravo L, Herrera J, Riverón AM, Javer E, Sanchez A, *et al*. DNA fingerprinting of *Vibrio cholerae* and *Aeromonas* species by pulsed-field minigel electrophoresis. Electrophoresis. 2006; 27(14):2857-64.
20. Riverón AM, López-Cánovas L, Herrera JA, Arencibia O. Manual de Usuario: Sistema Guefast 06 cámaras miniCHEF y miniTAFE, accesorios y unidad de control. La Habana Editorial CENIC, Primera Edición. 2006. pp. 1-35
21. Riverón AM, López-Cánovas L, Santos YM, Plasencia E, Corrales F. Registration certificate of the PFGESimulator software No.: 828-2011, 2011; CENDA, La Habana, Cuba.
22. López-Cánovas L, Galán L, Orozco E, Riverón A. Kinetic properties of DNA migration under clamped homogeneous electric field conditions DNA size, migration velocities and reorientation time determined in a single clamped homogeneous electric field run. Journal of Chromatography. 1998; 806:123-39.
23. Registro de equipo médico: Software GuefastScan. 2008. Certificado de registro de equipos médicos 2008 Nro. 0090414851200. CECMED Cuba. Prórroga del registro de equipo médico 2014, Código: no 81 MMH, no. Registro I 009041.
24. Dice LR. Measures of the amount of ecologic association between species. Ecology. 1945; 26:297-302.
25. Sukroongreung S, Lim S, Tantimavanich S, Eampokalap B, Carter D, Nilakul C, Kulkeratiyut S, Tansuphaswadikul S. Phenotypic switching and genetic diversity of *Cryptococcus neoformans*. Journal of Clinical Microbiology. 2001; 39:2060-4.
26. Saracli MA, Yildiran ST, Sener K, Gonlum A, Doganci L, Keller SM *et al.* Genotyping of Turkish environmental *Cryptococcus neoformans* var. *neoformans* isolates by pulsed field gel electrophoresis and mating type. Journal Compilation Blackwell Publishing Ltd Mycoses. 2006; 49:124-9.